

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：82505

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24245

研究課題名（和文）ヒト常在微生物叢におけるCRISPRの多型性を応用した新規個人識別法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel personal identification method using CRISPR diversity in the human microbiome

研究代表者

豊間根 耕地（Toyomane, Kochi）

科学警察研究所・法科学第一部・研究員

研究者番号：70845362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：CRISPRは原核生物が持つ、スペーサーと呼ばれる外来DNAに由来する短い配列と、スペーサーを挟むリピートを繰り返し単位とする、ゲノム上の繰り返し配列である。皮膚微生物叢中に存在する細菌のCRISPR領域について、そのDNA配列の多様性を解析した。CRISPR領域のスペーサー配列の多様性は個人間で類似性が低く、個人内で類似性が高かったことから、個人特異性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の表面にはヒトDNAより多量の微生物DNAが存在していると考えられており、ヒトDNAが十分に採れない場合の個人識別を目的として、これまでに各国で微生物叢の保持する遺伝情報を用いた個人識別法の開発が試みられてきた。しかしながら、先行研究の多くで用いられてきた16S rRNA遺伝子は微生物叢の構造を解析する上での解像度が低く、実用に至った手法はない。本課題で構築したCRISPRを用いた微生物叢解析は、解像度が高く、微生物叢解析による個人識別法の開発の実現につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：CRISPRs are prokaryotic genetic elements, composed of repeats that are interspaced by short sequences called spacer. CRISPR loci in the human skin microbiome were sequenced by amplicon sequencing. The spacers were significantly more individual specific than site specific, revealing that spacers in the skin microbiome were highly personalized.

研究分野：法科学

キーワード：微生物叢 CRISPR 個人識別

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物叢はある環境における微生物の集合体であり、微生物叢を構成する微生物の種やその組成は、環境が異なると変化する。これまでの多くの微生物研究では、ほぼ全ての細菌に共通する DNA 配列で分子系統樹の作成にも用いられる 16S rRNA 遺伝子をマーカーとして利用する、メタ 16S 解析と呼ばれる手法が用いられてきた。

近年、犯罪捜査のために、ヒトの皮膚微生物叢の情報を用いた個人識別法の開発が進められている。個人識別を目的とした微生物叢解析においてもメタ 16S 解析が用いられてきたが、メタ 16S 解析は個人識別における識別力が低いという、実用化に向けた課題を抱えている。申請者は真正細菌が持つ CRISPR をマーカーとした微生物叢解析を新たに提案し、皮膚微生物叢中に存在する CRISPR の DNA 配列を解析した。

2. 研究の目的

真正細菌と古細菌が持つ CRISPR はスペーサーと呼ばれる外来 DNA に由来する短い配列と、スペーサーを挟むリピートを繰り返し単位とするゲノム上の繰り返し配列である。CRISPR は原核生物におけるファージやプラスミドなどの感染に対する防御機構の構成因子で、宿主に感染したファージやプラスミドの DNA を切り取って、新しいスペーサーとして取り込む性質を持つ。個々の宿主が取り込む外来 DNA の配列は、その宿主が過去におかれた環境に依存しており、ファージやプラスミドの多様性を反映すると考えられる。以上の性質から、CRISPR のスペーサー配列は同一種においても高い多様性を示すことが知られており、結核菌などの病原細菌の分子疫学的な系統分類にも用いられてきた。本研究においては、スペーサーの多様性を PCR 法による増幅と次世代シーケンサーを用いて解析、個人間及び個人内の類似度を計算し、スペーサー配列の多様性が個人識別に有効か明らかにする。

3. 研究の方法

(1)皮膚微生物叢 CRISPR の探索

皮膚の微生物叢は *Cutibacterium* 属など、多数の細菌種によって構成されている。しかしながら、CRISPR の保有の有無やその存在比率などは細菌種によって異なる。そのため、皮膚微生物叢を構成する細菌種のうち、どの細菌種が保持する CRISPR が個人識別を目的とした際の解析対象として妥当かは明らかでない。そこで、公開データを用いて、皮膚微生物叢中の CRISPR の探索を行なった。Oh ら (doi: 10.1038/nature13786) によって得られた健常者 15 名分の皮膚微生物叢のメタゲノムデータについて、MEGAHIT による *de novo* アセンブリを行ない、ショートリードをつなぎ合わせたコンティグを得た。続いて CRISPR 探索プログラム PILER-CR を用いてコンティグから CRISPR 配列の探索を行なった。得られた CRISPR 配列はリピートの配列によって分類し、15 名の被験者のうち 2 名以上で観測された CRISPR を抽出した。抽出した CRISPR のリピートを含むリードについて、上記のメタゲノムデータから検索し、そのリード数を計測した。得られた結果から個人識別に有用と期待される 3 種の候補 CRISPR を選定した。

(2)皮膚微生物叢 CRISPR の多様性解析

5 名の健常者の皮膚を綿棒で拭い、皮膚スワブを得た。皮膚スワブの採取は 2-3 ヶ月の間隔を空けて 2 度行い、1 度目は掌を、2 度目は掌に加え肘と耳のスワブを回収した。得られた皮膚スワブから DNA を抽出し、3 種類の CRISPR のリピート上に設計したプライマーを用いて PCR 法

によりスペーサー配列の増幅を行なった。増幅産物について MiSeq (Illumina) によるシーケンシングを行い、スペーサー配列のアンプリコンシーケンスデータを取得した。得られた配列データは CLC Genomics Workbench (Qiagen) によるクオリティコントロールを行った。さらに QIIME2 を用いて各配列を Amplicon Sequence Variant (ASV) に割り当て、ASV の出現頻度表を用いて各試料におけるスペーサー配列の多様性解析を行なった。

4 . 研究成果

(1)皮膚微生物叢 CRISPR の探索

皮膚の微生物叢を構成する細菌種のうち、個人識別を目的とした解析対象として有用な CRISPR を明らかにするため、公開データを用いて、皮膚微生物叢中の CRISPR の探索を行なった。結果、皮膚微生物叢において *Streptococcus* 属や *Micrococcus* 属の細菌が保有する計 3 種類の CRISPR について、そのリピート配列が 80%以上の健常者の皮膚から検出された。以上から、これらの CRISPR のリピート上にプライマーを設計することで、皮膚微生物叢中の CRISPR 配列の多様性解析が実施可能と考えられた。

(2)皮膚微生物叢 CRISPR の多様性解析

次に、上述の 3 種の CRISPR についてリピート上にプライマーを設計し、アンプリコンシーケンシング法による多様性解析を実施した。3 種の CRISPR について、最大で 95%の試料で十分量のスペーサー配列が観測された。このことから、メタゲノムデータの再解析により普遍性が明らかになった 3 種の CRISPR が、実際に皮膚微生物叢中に存在することを実験的にも証明できた。

また、得られたスペーサー配列データについて、試料間の距離 (Bray-Curtis 非類似度) の計算を行なった。同一の被験者に由来する 2 試料間から計算される距離は、異なる被験者に由来する試料間の距離よりも有意に低かった。このことは、個人内では CRISPR のスペーサーの多様性が類似する一方で、異なる個人同士では CRISPR のスペーサーの多様性は類似しないということの意味している。従って、CRISPR の多様性解析を行うことで、ある 2 つの試料の類似性について評価可能と考えられ、個人識別への応用可能性が考えられた。

以上の結果から、皮膚微生物叢には共通した CRISPR が存在することが明らかになり、この CRISPR の多様性解析を実施することで個人を識別できる可能性が示唆された。一方、本研究は 5 名という少ない被験者を対象とした概念実証的研究であり、今後、多数の被験者を対象とした詳細な検証を加える必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toyomane Kochi, Yokota Ryo, Watanabe Ken, Akutsu Tomoko, Asahi Ai, Kubota Satoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Evaluation of CRISPR Diversity in the Human Skin Microbiome for Personal Identification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 e01255-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msystems.01255-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 豊間根耕地、横田亮、渡邊賢、阿久津智子、旭愛、窪田聡
2. 発表標題 CRISPRの多様性解析による個人識別法の開発
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊間根耕地、横田亮、渡邊賢、阿久津智子
2. 発表標題 皮膚常在細菌叢におけるCRISPRの多様性
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------